

(19) **KG** (11) **1225** (13) **C1** (46) **28.02.2010**

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(51) *A61K 35/23* (2009.01)
C12N 7/08 (2009.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20080018.1

(22) 14.02.2008

(46) 28.02.2010, Бюл. №2

(76) Джапаралиев Н.Т., Джапаралиев Т.О. (KG)

(56) Мамадалиев С.М., Кошембетов Ж.К., Керембекова У.Ж., Нурабаев С.Ш. Разработка оптимальных условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа при чуме мелких жвачных животных. // Актуальные вопросы диагностики болезней животных. – Спец. вып. материалов второй межд. конф. 2005. – С. 251-256

(54) **Сухая вирусвакцина против чумы мелких жвачных животных из штамма "PPR"**

(57) Изобретение относится к ветеринарии, микробиологии и медицины, в частности, для приготовления вакцины против чумы мелких жвачных животных. Задачей изобретения является разработка средства профилактики чумы мелких жвачных из местного специфического и экологически безопасного антигена. Поставленная задача решается тем, что в сухой вирусвакцине против чумы мелких жвачных животных, включающей вируссодержащий материал из аттенуированного штамма чумы мелких жвачных животных, стабилизатор, питательную среду, в качестве вируссодержащего материала используют местный адаптированный специфический штамм «PPR», репродуцированный на первично-трипсинизированной культуре клеток почки козленка с титром $10^{-6.5}$ тератогенного цитопатического действия (ТДЦ)₅₀/мл.

(21) 20080018.1

(22) 14.02.2008

(46) 28.02.2010, Bull. №2

(76) Dzhaparaliev N.T., Dzhaparaliev T.O. (KG)

(56) Mamadaliev S.M., Koshembetov Zh.K., Kerembekova U.Zh., Nurabaev S.S., Working out of optimum conditions for conduction of indirect variant of immune-enzyme analysis at plague cases of small ruminant animals. // Actual questions of animals illnesses diagnostics. - Special issue of materials of second international conference. 2005. - pages 251-256

(54) **Dry vaccine against the plague of small ruminants from "PPR" strain**

(57) Invention relates to veterinary science, microbiology and medicine, in particular, for preparation of vaccine against plague of small ruminants. The invention problem is working out of preparation for prophylaxis of the small ruminants plague from the local specific and environmentally safe antigene. The assigned task is decided by that in dry vaccine against the plague of small ruminants, including viruliferous material from attenuated strain of small ruminants plague, stabilizer, nutrient medium, the local adapted specific «PPR» strain is used, as a viruliferous material, which («PPR» strain) is reproduced on the base

(19) **KG** (11) **1225** (13) **C1** (46) **30.01.2010**

of initially-trypsinized culture of kidney cages of a kid with titre $10^{-6.5}$ of teratogenic cytopathic effect (TCE) $_{50}/\text{ml}$.

Изобретение относится к ветеринарии, в частности, к приготовлению вирусвакцины против чумы мелких жвачных животных.

Известна вирусвакцина из штамма «ЧМЖЖ», применяемая против чумы мелких жвачных в России, странах Ближнего Востока, Центральной Азии (Мамадалиев С.М., Кошембетов Ж.К., Керембекова У.Ж., Нурабаев С.Ш. Разработка оптимальных условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа при чуме мелких жвачных животных. // Актуальные вопросы диагностики болезней животных. – Спец. вып. материалов второй межд. конф. 2005. – С. 251-256).

Недостатком вирусвакцины из штамма «ЧМЖЖ» является то, что данная вирусвакцина неустойчива, экологически небезопасна, имеет низкую иммуногенность, так как обладает реверсией. Указанные недостатки данной вирусвакцины ограничивают ее применение в ветеринарной практике против чумы мелких жвачных.

Задачей изобретения является разработка средства профилактики чумы мелких жвачных животных из местного специфического и экологически безопасного антигена.

Поставленная задача решается тем, что в сухой вирусвакцине против чумы мелких жвачных животных, включающей вируссодержащий материал из аттенуированного штамма чумы мелких жвачных животных, стабилизатор, питательную среду, в качестве вируссодержащего материала используют местный адаптированный специфический штамм «PPR», репродуцированный на первично-трипсинизированной культуре клеток почки козленка с титром $10^{-6.5}$ ТДЦ $_{50}/\text{мл}$.

Поддержание штамма.

Вакцинный штамм "PPR" сохраняют при температуре минус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ в лиофилизированном виде. Штамм периодически (через каждые 3 года) "освежают" в культуре клеток почки козленка с последующей лиофилизацией. Титр вируса вакцинного штамма за указанный срок хранения может снизиться в пределах $1.0 \lg$ ТДЦ $_{50}/\text{мл}$. При этом допускается не более 10-кратное его пассирование.

Очередную серию вакцинного штамма готовят из лиофилизированного вируса в количестве 150-200 ампул. Для "освежения" вируса отбирают необходимое количество матрасов с выросшей монослойной культурой почки козленка 5-10 суточного возраста.

В культуре не должно быть каких-либо признаков спонтанной дегенерации клеток (зернистость, вакуолизация клеток, очаги разрушения клеток, отслоения клеток от стекла, изменения характерной формы клеток).

Берут 2-4 ампулы, содержащие по 2 мл лиофилизированного вируса, содержимое их разводят в 10-кратном объеме поддерживающей среды. Среду выращивания из матрасов с культурой клеток сливают и в них вносят разведенный вирус в объеме по 20 мл в 1.5 литровые матрасы. Инфицированные культуры выдерживают в термостате при $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ в течение 1 часа с периодическим орошением поверхности матраса монослоя клеток внесенным вирусом. После этого в сосуды вводят поддерживающую среду по 200 мл в 1.5-литровые матрасы.

Для контроля оставляют незараженными 2-3 матраса, в которые вносят только поддерживающую среду и инкубируют как инфицированные в стационарном положении при $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. Смену среды в матрасах проводят через каждые 3 суток. Развитие вируса в культуре клеток определяют по характерному цитопатическому действию. Микроскопию матрасов проводят ежедневно.

При развитии выраженных цитопатических изменений (70-90 % клеточного монослоя), обычно на 5-10 сутки, матрасы замораживают при температуре минус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$. В контрольных матрасах не должно быть каких-либо деструктивных изменений клеток. На следующие сутки замороженные культуры оттаивают при комнатной температуре, из каждого матраса берут пробы в количестве по 5 мл для проверки на отсутствие бактериального загрязнения и определения активности вируса. Вирусную суспензию до получения результатов контроля на стерильность и определения активности хранят при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ не более 15 суток. При активности вируса не ниже $10^{-5.5}$ ТДЦ $_{50}/\text{мл}$ стерильный вируссодержащий материал используют для приготовления серии вакцинного вируса. С этой целью содержимое стерильных матрасов сливают в один сосуд, добавляют стабилизирующий раствор, охлажденный до $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, в соотношении 1:1 пенициллин 500000 ЕД, стрептомицин 500 мг на 1 литр смеси.

Приготовленную смесь разливают в стерильные ампулы по 2 мл и ставят в металлические кассеты, которые устанавливают на предварительно охлажденные, до температуры минус 10-20°C полки штатива.

Штатив помещают в низкотемпературную камеру и проводят замораживание содержимого ампул до температуры 57-58°C в течение 8-12 часов. Затем штатив с ампулами переносят в охлажденную камеру вакуумной сублимационной установки. После высушивания ампулы запаивают при остаточном давлении от 15 ПА до 30 ПА.

До заключения о качестве препарат в ампулах хранят при температуре (4±1)°C. При получении положительных результатов ампулы этикетируют, упаковывают и закладывают на хранение при температуре (4±1)°C.

Контроль вакцинного штамма.

Вакцинный штамм подвергают техническому и биологическому контролю. Через каждые 5 пассажей штамм проверяют на специфичность в реакции нейтрализации, на способность вируса размножаться в культуре клеток почки козленка с характерными цитопатическими изменениями и накапливаться в ней в титрах $10^{-5.5}$ – $10^{-6.0}$ ТЦД₅₀/мл.

Для проверки специфичности вакцинного штамма используется иммунная сыворотка, полученная от коз на 21 сутки после введения вируса штамма «PPR». Сыворотка должна быть стерильной, вируснейтрализующая активность ее должна быть не ниже 2.0 lg ТЦД₅₀/мл. Специфичность цитопатического действия вируса проверяют одновременно с его титрованием.

Пример. Процесс получения вирусосодержащей суспензии производственного вирусвакцины чумы мелких жвачных животных из штамма "PPR" включает следующие операции:

- отбор сосудов с выросшей монослойной культурой клеток почки козленка;
- инфицирование сосудов вирусом;
- инкубирование зараженных сосудов;
- микроскопия;
- отбор сосудов для замораживания, взятие проб для контроля на стерильность и замораживание при минус (40±1)°C;
- оттаивание;
- слив вирусосодержащего материала в одну емкость;
- определение биологической активности вируса.

Для получения вакцины используют выращенную в матрасах культуру клеток почки козленка с хорошим монослоем 5-10 суточного возраста.

Для изготовления 800000 доз вирусвакцины необходимо получить 8.0 л суспензии. Для этого берут 48 матрасов емкостью 1.5 л и с культурой клеток, в них вносят (200±20) мл, вирусной суспензии разведенной поддерживающей средой (доза заражения 0.05-0.06 ТЦД на клетку). Зараженные матрасы культивируют в стационарном положении при температуре (37±0.5)°C. Срок культивирования вируса в круговых сосудах 3-4 суток без смены среды. Для контроля незараженными оставляют по 3 сосуда, которых поддерживают в одинаковых условиях с инфицированными. Начиная с 2 суток инкубирования, инфицированные сосуды ежедневно микроскопируют.

Сосуды, в которых наблюдается цитопатические изменения на 70-90 % клеточного монослоя (обычно на 3-4 сутки), отбирают из каждого сосуда, делают высевы на стерильность, замораживают при минус (40±1)°C, сохраняют при этой температуре до получения результатов контроля стерильности.

Содержимое сосудов без бактериального загрязнения оттаивают, сливают в одну емкость, тщательно перемешивают, из общей массы берут 3 пробы для определения биологической активности. Титр вирусосодержащей суспензии должен быть не ниже $10^{-5.5}$ ТЦД₅₀/мл. Вирусосодержащую суспензию до получения результатов по определению биологической активности хранят при температуре 4°C не более 15 суток.

Примерный расчет потребности основных компонентов для приготовления 800000 доз вакцины:

– животные: 4 козленка – 2 месячного возраста для получения первично-трипсинизированной культуры клеток почки козленка, раствор Хенкса – 8 л; 0.25 %-ный раствор трипсина – 8 л; среда ПСП – 70 л; сыворотка крупного рогатого скота – 3.2 л; 8.0 % раствор соды (двууглекислого натрия) – 1.8 л; пенициллин – 245 млн; нистатин 3650000 ЕД; стрептомицин – 245 г; матриксная расплодка вируса – 900 мл; пептон – 2 кг; сахароза – 1.2 кг. На брак допускается 20 % материалов.

К вирусосодержащей культуральной жидкости добавляют защитную среду, охлажденную до (4±1)°C, в соотношении 1:1, пенициллин 500000 ЕД и стрептомицин 0.5 г на 1 л смеси. Со-

держимое сосуда тщательно перемешивают. Смесь разливают при помощи специальных дозирующих аппаратов или шприцами-автоматами по 2 мл в стерильные ампулы или флаконы по 2 мл.

Заполненные вирусвакциной ампулы или флаконы помещают в металлические кассеты, покрывают стерильной тканевой салфеткой и переносят в цех сушки.

Технология получения сухой вирусвакцины сублимационным методом состоит из предварительного замораживания смеси вируссодержащей суспензии с защитной средой, разлитой в ампулы или флаконы, и последующего удаления влаги из замороженного состояния в вакууме на установке типа SMV.

Ампулы с высушенной вакциной запаивают на карусельно-коллекторном аппарате при остаточном давлении от 15 Па до 30 Па. Флаконы с вакциной перекрывают стерильными резиновыми пробками под вакуумом в камере сублимационной установки при впуске воздуха или в вакуумной установке и обкатывают металлическими колпачками. Запаянные ампулы и закрытые флаконы проверяют визуально на отсутствие трещин.

После заключения о возможности выпуска препарата к практическому применению ампулы или флаконы с вакциной этикетируют и упаковывают.

Формула изобретения

Сухая вирусвакцина против чумы мелких жвачных животных, включающая вируссодержащий материал из аттенуированного штамма чумы мелких жвачных животных, стабилизатор, питательную среду, отличающаяся тем, что в качестве вируссодержащего материала используют местный адаптированный специфический штамм "PPR", репродуцированный на первично-трипсинизированной культуре клеток почки козленка с титром $10^{-6,5}$ ТДЦ₅₀/мл.

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба ИС КР, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03